

PCT/JP 03/11473

09.09.03

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

Rec'd PCT/PTG

10 MAR 2005

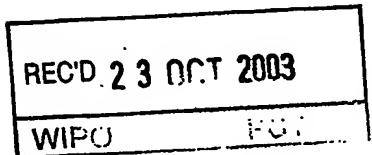
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 9月10日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-263834
[ST. 10/C]: [JP2002-263834]

出 願 人
Applicant(s): 天野エンザイム株式会社

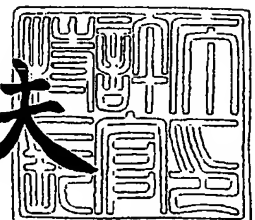


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-656

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県各務原市須衛町四丁目 1 7 9 番 3 5 天野エン
ザイム株式会社 岐阜研究所内

【氏名】 結城 健介

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県各務原市須衛町四丁目 1 7 9 番 3 5 天野エン
ザイム株式会社 岐阜研究所内

【氏名】 鷺津 欣也

【特許出願人】

【識別番号】 000216162

【氏名又は名称】 天野エンザイム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100095577

【弁理士】

【氏名又は名称】 小西 富雅

【選任した代理人】

【識別番号】 100100424

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 知公

【選任した代理人】

【識別番号】 100114362

【弁理士】

【氏名又は名称】 萩野 幹治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 045908

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0201265

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスグルタミナーゼ生産菌

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobar aensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

【請求項2】 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、請求項1に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

【請求項3】 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、請求項1又は2に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

【請求項4】 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求項1～3のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

【請求項5】 外来的に導入した配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有するDNA断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

【請求項6】 ストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112又はその変異株の形質転換体である、請求項1～5のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

【請求項7】 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスを、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び

產生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 8】 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、請求項 7 に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 9】 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、請求項 7 又は 8 に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 10】 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求項 7～9 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 11】 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、外来的に導入された配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、請求項 7～9 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 12】 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 又はその変異株の形質転換体である、請求項 7～11 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 13】 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

【請求項 14】 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、請求項 13 に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

【請求項 15】 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、請求項 13 又は 14 に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

【請求項 16】 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求項 13～15 のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス

【請求項 1 7】 外来的に導入された配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

【請求項 1 8】 ストレプトマイセス・リビダンス 3131 又はその変異株の形質転換体である、請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

【請求項 1 9】 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) を、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び

產生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 2 0】 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、請求項 1 9 に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 2 1】 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、請求項 1 9 又は 2 0 に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 2 2】 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 2 3】 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、外来的に導入された配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、請求項 1 9 ～ 2 1 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【請求項 2 4】 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、ストレプトマイセス・リビダンス 3131 又はその変異株の形質転換体である、請求項 1

9～23のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は放線菌由来のトランスグルタミナーゼを生産する菌株、及び該菌株を利用したトランスグルタミナーゼの生産方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

トランスグルタミナーゼはペプチド鎖内にあるグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素であり、特にタンパク質中のリジン残基の ϵ -アミノ基とタンパク質分子内及び分子間に ϵ -(γ -Gln)-Lys架橋結合を形成する。この性質を利用して当該酵素は食品分野、医薬分野等においてタンパク質の加工に広く用いられている。

【0003】

古くからトランスグルタミナーゼは動物由来のものが知られていた。例えばモルモットの肝臓や哺乳動物の臓器、血液に広く分布していることが報告されており (Connellan, et al., Journal of Biological Chemistry 246巻4号, 1093-1098 (1971)、Folk et al., Advances in Enzymology 38巻, 109-191 (1973)、Folk et al., Advances in Protein Chemistry 31巻, 1-133 (1977))、その酵素の特徴についても研究されている。一方、放線菌からは上記動物由来のトランスグルタミナーゼとは性質が異なる、カルシウム (Ca^{2+}) 非依存性のトランスグルタミナーゼが発見されている。具体的にはストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) [旧称：ストレプトベルチシリウム・モバラエンシス (*Streptoverticillium mobaraense*)] IF013819 (特開昭64-27271号公報)、ストレプトマイセス・グリセオカルネウス (*Streptomyces griseocarneus*) [旧称：ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム (*Streptoverticillium griseocarneum*)] IF012776、ストレプトマイセス・シナモネウス (*Streptomyces cinnamoneus*) [旧称：ストレプトベルチシリウム・シナモネウム (*Streptoverticillium cinnamoneum*)] IF012852 (特開2001-186884号公報) 等からトランスグルタミナーゼが

単離、同定されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

従来トランスグルタミナーゼは自然界に存在する動物、菌類等から抽出、分離等を経て製造されていたため、供給量、供給費用等の点で改善すべき点が多くあった。一方、微生物由来のトランスグルタミナーゼについては遺伝子組換え操作を利用した生産方法の研究が精力的に行われている。しかしながら、遺伝子組換え操作を利用した最初の報告 (Biosci. Biotech. Biochem., 58, 82-87 (1994)、特開平5-199883号公報) によればその生産量は0.1mg/l程度であって工業的生産レベルには程遠いものであった。また、最近の報告 (特開2001-186884号公報) によればある程度は生産レベルが向上しているものの、2週間の微生物培養によって40～50mg/l程度の生産性しか示さず、十分な生産性とは言い難い。

本発明は以上の背景に鑑みなされたものであって、トランスグルタミナーゼを高効率で生産し得る菌株、及び該菌株を用いたトランスグルタミナーゼの生産方法を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意検討を行った。即ち、放線菌由来のトランスグルタミナーゼを発現させる場合において、トランスグルタミナーゼ構造遺伝子、プロモーター、ベクター、及び宿主放線菌の組合せを検討した。その結果、トランスグルタミナーゼの生産性の極めて高い形質転換体を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。本発明は次の構成を提供する。

[1] ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

[2] 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、[1]に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

[3] 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、[1]又は[2]に記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

[4] 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、[1]～[3]のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

[5] 外来的に導入した配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有するDNA断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

[6] ストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112又はその変異株の形質転換体である、[1]～[5]のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシス。

[7] ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスを、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び產生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

[8] 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、[7]に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[9] 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、[7]又は[8]に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[10] 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、[7]～[9]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[11] 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、外来的に導入された配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトラン

スグルタミナーゼをコードする配列を有するDNA断片を保有する、[7]～[9]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[12] 前記形質転換体ストレプトマイセス・モバラエンシスが、ストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112又はその変異株の形質転換体である、[7]～[11]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[13] ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[14] 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、[13]に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[15] 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、[13]又は[14]に記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[16] 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、[13]～[15]のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[17] 外来的に導入された配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有するDNA断片を保有する、形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[18] ストレプトマイセス・リビダンス3131又はその変異株の形質転換体である、[13]～[17]のいずれかに記載の形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス。

[19] ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) を、前記構造遺伝子を発現可能な条件で培養する工程、及び

產生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

[20] 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、[19]に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[21] 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、[19]又は[20]に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[22] 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、[19]～[21]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[23] 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、外来的に導入された配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有するDNA断片を保有する、[19]～[21]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

[24] 前記形質転換体ストレプトマイセス・リビダンスが、ストレプトマイセス・リビダンス3131又はその変異株の形質転換体である、[19]～[23]のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の構成を詳細に説明する。

本発明では、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターが外来的に導入された形質転換体である放線菌 (ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス) が提供される。

ここでのトランスグルタミナーゼの構造遺伝子は、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来である限りその種類は特に限定されない。例えばストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112が保有するトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を

用いることができる。構造遺伝子の具体例としては配列番号1の塩基配列からなるDNAを挙げることができる。尚、ストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112は受託番号FERM P-18980で以下の国際機関に寄託されている。

国際寄託機関

名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

住所：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 中央第6

寄託日：平成14年（2002年）8月20日

【0007】

トランスグルタミナーゼの構造遺伝子は例えば次のようにして取得することができる。即ち、ストレプトマイセス・モバラエンシスの染色体DNAライブラリーを構築し、このライブラリーをトランスグルタミナーゼの構造遺伝子に特異的なプローブを用いてスクリーニングする。そして、選択されたクローンから制限酵素処理によって挿入されたDNA断片を取得する。尚、PCR法等を利用した公知の合成方法によってもトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を調製することができる。

【0008】

配列番号1に記載されるDNAの一部が改変されたDNA（以下、「改変DNA」ともいう）であっても、それがコードするタンパク質がトランスグルタミナーゼ活性を有する限り本発明における構造遺伝子として利用できる。尚、ここでのトランスグルタミナーゼ活性の程度はできるだけ高い方が好ましい。例えば、配列番号1の配列からなるDNAがコードするタンパク質のトランスグルタミナーゼ活性と同等であることが好ましい。

【0009】

改変DNAの具体例としては、配列番号1の配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。尚、ここでいう「ストリンジェントな条件」とはいわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、ハイブリダイゼーション液（50%ホルムアルデヒド、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、5×Denhard

t溶液、1% SDS、10% デキストラン硫酸、10 μ g/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5))を用いて42℃でインキュベーションし、その後0.1 \times SSC、0.1% SDSを用いて68℃で洗浄する条件である。更に好ましいストリンジェントな条件としては、ハイブリダイゼーション液として50%ホルムアルデヒド、5 \times SSC(0.15M NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)、1 \times Denhardt溶液、1%SDS、10%デキストラン硫酸、10 μ g/mlの変性サケ精子DNA、50mMリン酸バッファー(pH7.5))を用いる条件を例示することができる。

【0010】

改変DNAの他の例として、配列番号1に示される塩基配列において1若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。塩基置換などの変異は複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは変異の対象となる塩基がコードするアミノ酸の種類や位置などによっても異なるが、2～40個、好ましくは2～20個、より好ましくは2～10個である。尚、このような改変には5'末端、3'末端、又はその他の部位への制限酵素切断配列の導入や、シグナルペプチドをコードする配列の付加などが含まれる。

【0011】

以上のような改変DNAは、例えば部位特異的変異法を用いて、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように配列番号1の配列を有するDNAを遺伝子工学的に改変することによって得られる。また、トランスグルタミナーゼ遺伝子を保有するストレプトマイセス・モバラエンシスを紫外線で処理し、その後改変されたトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を単離することなど、公知の変異処理を利用した方法によっても取得することができる。

尚、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等の変異にはストレプトマイセス・モバラエンシスの個体差に基づく場合等、天然に生じる変異も含まれる。

【0012】

例えば、天然に存在するストレプトマイセス・モバラエンシスがこのような改変DNAを有する場合には、当該菌株からゲノム(染色体)DNAを抽出し、これを適

当な制限酵素で処理した後に、配列番号1のDNA又はその一部をプローブとしたスクリーニングにおいてストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAを選択、単離することによって改変DNAを得ることができる。

【0013】

プロモーターは上記の構造遺伝子に作用するものが採用される。好ましくは、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターを採用する。更に好ましくは、使用される構造遺伝子と由来が同一のプロモーターを採用する。例えば、上記のようにしてストレプトマイセス・モバラエンシスからトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を取得する際に、当該構造遺伝子に加えてそのプロモーター領域も含むDNA断片を取得し、このDNA断片を本発明における構造遺伝子及びプロモーターとして用いることができる。

【0014】

ターミネーターについても上記の構造遺伝子に作用するものが採用される。好ましくは、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターを採用する。更に好ましくは、使用される構造遺伝子と由来が同一のターミネーターを利用する。例えば、上記のようにしてストレプトマイセス・モバラエンシスのトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を取得する際に、当該構造遺伝子に加えてそのターミネーター領域も含むDNA断片を取得し、このDNA断片を本発明における構造遺伝子及びプロモーターとして用いることができる。

【0015】

ここでプロモーター、構造遺伝子、及びターミネーターの全てが同一のストレプトマイセス・モバラエンシスに由来することが特に好ましい。このような態様の例としては、配列番号2の配列を有するDNA断片を含む宿主ストレプトマイセス・モバラエンシスを用いる場合を挙げることができる。このようなDNA断片は、例えば上記のようにしてストレプトマイセス・モバラエンシスからトランスグルタミナーゼの構造遺伝子を取得する際に、当該構造遺伝子に加えてそのプロモーター及びターミネーター領域も含むようにして調製することができる。

ここで、配列番号2の配列からなるDNAの一部が改変されたDNA（改変DNA）であっても、それがコードするタンパク質がトランスグルタミナーゼ活性を有する

限り同様に利用することができる。尚、ここでのトランスグルタミナーゼ活性の程度はできるだけ高い方が好ましい。例えば、配列番号2の配列からなるDNAがコードするタンパク質のトランスグルタミナーゼ活性と同等であることが好ましい。

【0016】

上記の配列番号1のDNAの場合と同様に、ここでの改変DNAの具体例としては配列番号2の配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAや、配列番号2に示される塩基配列において1若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。その他、改変の許容される範囲、改変DNAの調製方法などについても配列番号1のDNAの場合と同様である。

【0017】

上記の構造遺伝子、プロモーター、ターミネーターが外来的に導入された形質転換体である放線菌（ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス）は、当該構造遺伝子等を含有した発現ベクターで宿主放線菌（ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス）を形質転換することによって作製される。

形質転換に供されるストレプトマイセス・モバラエンシスとしては、例えばストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112（受託番号FERM P-18980）又はその変異株を用いることができる。他方、ストレプトマイセス・リビダンスとしては、例えばストレプトマイセス・リビダンス3131（ATCC 35287）又はその変異株を用いることができる。変異株の作製には例えば紫外線照射等の公知の方法を用いることができる。

【0018】

発現ベクターの構築には放線菌の形質転換に使用可能な市販のベクターなど、公知のベクターを利用することができる。例えば、pUC19、pBR322、pBluescriptなどの大腸菌を宿主とするプラスミドと、ストレプトマイセス・リビダンス3131

が保有するプラスミドpIJ702などの放線菌を宿主とするプラスミドとを組み合わせ、発現ベクターを構築することができる。発現プラスミドの具体例を以下に示す。まず、pUC19とpIJ702を用いて大腸菌の複製開始点及び放線菌の複製開始点を併せ持つシャトルベクターを構築する。一方で、ストレプトマイセス・モバラエンシスからトランスグルタミナーゼのプロモーター、構造遺伝子、及びターミネーターを含むDNA断片を単離し、pUC19の適当な制限酵素サイトに挿入する。次に、このプラスミドにpIJ702及び上記のシャトルベクターを用いてtsr（チオストレプトン耐性）遺伝子を挿入し、大腸菌の複製開始点、Amp^r（アンピシリン耐性）遺伝子、放線菌の複製開始点、及びtsr（チオストレプトン耐性）遺伝子、並びにトランスグルタミナーゼのプロモーター、構造遺伝子、及びターミネーターを含む発現ベクターを得る。

ベクターを構築する際の制限酵素処理、DNA断片の挿入等は常法により行うことができる。

尚、このようなストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに当該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含む発現ベクターは、ストレプトマイセス・リビダンス及びストレプトマイセス・モバラエンシス以外のストレプトマイセス属に属する微生物の形質転換にも利用できる。

【0019】

以上のようにして構築した発現ベクターを用いた放線菌（ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス）の形質転換は、プロトプラスト化した宿主放線菌に発現ベクターを導入する方法で行うことができる。このような形質転換を、宿主である放線菌が生育可能な条件下で行うことが好ましい。本発明者らが検討したところでは、このような方法によれば形質転換効率が顕著に上昇した。その他の条件、操作方法などは常法（例えばTurnerら方法（Gene, 36, 321-331(1985)）において採用されるものを適宜選択して用いることができる。ここでの「宿主である放線菌が生育可能な条件」とは、放線菌の生育に必要なとされる栄養素が反応液中に含有された条件をいい、具体的には例えば肉エキス、イーストエキス、及び／又はペプトン（ポリペプトン、トリプトンペプト

ン、カゼインペプトンなどを含む)が反応液中に含有された条件をいう。より高い形質転換効率を得るために、宿主のプロトプラスト化工程、及びプロトプラスト化した宿主へのベクターの導入工程の両者をこのような条件下で行うことがさらに好ましい。

形質転換体の選択は発現ベクターに予め組み込んだtsr遺伝子などの選択マーカを利用して行うことができる。

【0020】

選択された形質転換体、即ちストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、プロモーター、及びターミネーターが外来的に導入された宿主放線菌(ストレプトマイセス・モバラエンシス又はストレプトマイセス・リビダンス)を、トランスグルタミナーゼの構造遺伝子を発現可能な条件で培養することによりトランスグルタミナーゼを産生させることができる。形質転換体の培養用の培地は炭素源、窒素源、及び必要に応じて無機塩化物(無機イオン)を含むものを用いることができる。形質転換体の生育を促進するために、ビタミン、アミノ酸などを添加した培地を用いることもできる。炭素源としては例えばグルコース、デンプン、デキストリン等を採用でき、窒素源としては例えばポリペプトン、イーストエキス、肉エキス等を採用でき、無機塩化物としてはリン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム等を採用できる。

【0021】

形質転換体を培養する際の培養温度は例えば15℃～37℃の範囲であり、好ましくは25℃～35℃の範囲である。また、培地のpHは例えば5.0～8.0、好ましくは6.0～7.5に調整される。

【0022】

形質転換体を所望時間培養した後の培養液又は菌体よりトランスグルタミナーゼを回収することができる。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離、精製を行うことによりトランスグルタミナーゼを取得することができる。他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体

を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことによりトランスグルタミナーゼを取得することができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破碎、分離、精製）を行ってもよい。

【 0 0 2 3 】

【実施例】

本実施例では、特に記載しない限り制限酵素およびその他の遺伝子操作用酵素として宝酒造株式会社または東洋紡績株式会社の製品を用いた。尚、酵素の反応条件等は添付の取り扱い説明書に従った。

【 0 0 2 4 】

[実施例 1] 放線菌用ベクターpIJ702の取得

プラスミドpIJ702を保有するストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) 3131(ATCC 35287)を以下の培地条件で30℃、2日間培養した。

YEME培地 + 0.5%グリシン + 50 μ g/mlチオストレプトン

イースト・エキス	3g
ペプトン	5g
マルト・エキス	3g
塩化マグネシウム	1g
グルコース	10g
サッカロース	340g
グリシン	5g

50mg/ml チオストレプトン溶液（シグマ：ジメチルスルホキシド溶液）1ml
／ L (pH7.0)

【 0 0 2 5 】

培養後の培地200mlを遠心分離（12,000g、4℃、10分間）し、得られた菌体を50mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA、25% Sucrose（以下、「TE-Sucrose」という）10mlに懸濁した。次に30mg/mlのリゾチーム（シグマアルドリッチジャパン社製）を含むTE-Sucrose 2ml及び0.25mM EDTA 4mlを加え、これを37℃で30分間インキュベートした。インキュベート後20% SDS 2mlを加え、さらに5M NaCl 5mlを

加えて穏やかに攪拌した後、0℃で1晩インキュベートした。

【0026】

次に遠心分離（100,000g、4℃、40分間）により得られた上清に30% ポリエチレングリコール6000を終濃度10%になるように加え、0℃で4.5時間インキュベートした。その後、遠心分離（900g、4℃、5分間）し、沈殿を10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA、50mM NaCl に溶解した。そして塩化セシウム16.8g及び10mg/mlの濃度にエチジウムブロマイドを10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA（以下、「TE」という）に溶かして調整した溶液1.2mlを加え、遠心分離（1,300g、室温、15分間）により残さを取り除いた後、再び遠心分離（230,000g、20℃、12時間）を行った。遠心後、紫外線照射下でプラスミドDNA層を得た。次にTEで飽和したブタノールによる抽出を行ってエチジウムブロマイドを除いた。この抽出を3回繰り返して行った。得られたプラスミドDNA溶液はTEを透析外液として4℃で1晩の透析に供した。その後、TE飽和フェノールで1回、クロロホルム・イソアミルアルコールで2回抽出処理を行った。次に、1/10容量の3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) 溶液と2倍容量のエタノールを加え、-80℃に30分間静置した。その後、遠心分離（12,000g、4℃、15分間）により沈殿を回収し、沈殿を70% エタノールで洗浄し、乾燥させた。これをTE 200 μ l に溶かした。以上の操作によって最終的に得られたDNA量は約10 μ gであった。

【0027】

[実施例2] pIJ702を保有するストレプトマイセス・リビダンス3131(ATCC 35287)からのチオストレプトン感受性株の取得

pIJ702を保有するストレプトマイセス・リビダンス3131(ATCC 35287)をYEME培地で30℃、7日間培養した。次に、培養液をYEME培地で $10^5 \sim 10^9$ 倍に希釈し、それぞれの希釈液を100 μ l ずつYEME寒天培地（YEMEに1.5%寒天を加えたプレート寒天培地）5枚にまき、30℃で1週間培養した。培養後RepliPlate™ Colony Transfer Pad（宝酒造株式会社製）を用い、200 μ g/ml チオストレプトンを含むYEME培地にレプリカし、30℃で1週間培養した。そしてプラスミドpIJ702を脱落してチオストレプトン感受性となった株を選択し、これをストレプトマイセス・リビダンス3131-TSとした。これを後の形質転換の宿主として用いた。

【0028】

[実施例3] シャトルベクター-pSV1の取得

シャトルベクター-pSV1を図1に示す方法で構築した。まず、大腸菌用ベクター-pUC19（宝酒造株式会社製）を制限酵素BamHIで消化したDNA断片と、放線菌用ベクター-pIJ702をBclI（宝酒造株式会社製）で消化して得られるtsrを含むDNA断片を用意し、これらをDNA Ligation Kit（宝酒造株式会社製）を用いて連結することによりpUCTSRを作製した。次にpUCTSRをKpnI、ClaI（宝酒造株式会社製）で消化して得られるDNA断片（長断片）と、pIJ702をKpnI、ClaI（宝酒造株式会社製）で消化して得られるDNA断片（短断片）を用意し、これらをDNA Ligation Kit（宝酒造株式会社製）を用いて連結した後、大腸菌DH5株（東洋紡株式会社）に形質転換した。こうして得られた形質転換体を持つpUC19断片とpIJ702断片が連結したプラスミドをシャトルベクター-pSV1とし、後の操作に用いた。

【0029】

[実施例4] トランスグルタミナーゼ分泌発現プラスミドpUJ51BDの作製

トランスグルタミナーゼ遺伝子を保有する分泌発現プラスミドpUJ51BDを図2に示す方法で構築した。まず、ストレプトマイセス モバラエンシスS-8112（受託番号FIRM P-18980）から単離されたトランスグルタミナーゼ（以下、「BTG」ともいう）遺伝子BamHI断片を含むファージDNA（λ BTG、特開平5-19988 3号公報）から約6.6kbのBglIII-BamHI断片を切り出してpUC19のBamHIサイトに挿入したプラスミドpBTG-BBを作製した。pBTG-BBから3'の不要な領域をKilo-Sequencing用 Deletion Kit（宝酒造株式会社製）を用いて欠失させ、約3.9kbのBTG遺伝子を含むプラスミドpU51Bを作製した。次にpU51BのPstIサイトに放線菌用ベクター-pIJ702のPstI消化DNA断片を挿入したプラスミドpUJ51Bを作製した。pUJ51BからXbaI-ClaI断片を切り出し、実施例3で得た大腸菌-放線菌シャトルベクター-pSV1のXbaI-ClaI断片と置換することでpIJ702由来のmel（チロシナーゼ）遺伝子を除去したBTG分泌発現プラスミドpUJ51BDを構築した。

【0030】

[実施例5] プロモーター領域の塩基配列解析

BTGの構造遺伝子の配列（配列番号1）から塩基配列解析用の合成プライマーB

B-23[インヴィトロジェン(株)]5'-ACACCGCACTCATAGTGGCG-3' (配列番号3) を合成した。プロモーター領域の3'側からプライマーBB-23を用いて、5'側からM13-RV (宝酒造株式会社製) を用いてプラスミドpBTG-BBの塩基配列を解析した。得られた塩基配列解析の結果から更に合成プライマーBB-19 5'-TCCGTGCGAGTGGAAGAAGC-3' (配列番号4)、SP6-20 5'-GACGGCCTCCGAATAAC-3' (配列番号5) を合成し、これらを用いたプライマーウォーキングによりプロモーター領域約700bpの全塩基配列を決定した(図3)。同様に、合成プライマーSP6-32 5'-ATGTCGAGGGACAGGAAC-3' (配列番号6) とSP6-36 5'-CACCACGAAAGTCGCTAC-3' (配列番号7) を用いたプライマーウォーキングにより約500bpのターミネータ領域の塩基配列を決定した。その結果、プロモーター領域、構造遺伝子、及びターミネータ領域からなる塩基配列(配列番号2) が同定された(図4、図5)。尚、Sequence反応はBigDye™ Terminator Cycle Sequencing FS Ready Kit (アプライド・バイオシステムズ) を用い、解析はABI PRISM 310シーケンサー (アプライド・バイオシステムズ) を使用した。

【0031】

[実施例6] ストレプトマイセス・リビダンス3131-TS プロトプラストの調製

実施例2で取得したストレプトマイセス・リビダンス3131-TSをYEME培地(0.5%グリシン)で30℃、2日間培養した。培養後の培地200mlを遠心分離(1,300g、室温、10分間)し、得られた菌体を0.35Mサッカロース溶液72mlに懸濁した。次に、この懸濁液を遠心分離(1,300g、室温、10分間)し、菌体を1mg/mlのリゾチーム(シグマアルドリッチジャパン社)を含むP緩衝液60mlに再懸濁し、これを30℃、2.5時間インキュベートした。インキュベート後の懸濁液を脱脂綿でろ過して残さを取り除いた。次に得られたろ液を遠心分離(1,300g、室温、10分間)し、沈渣をP緩衝液25mlで洗浄した。この洗浄を2回繰り返した後、沈殿をP緩衝液1mlに懸濁し、これをプロトプラスト懸濁液とした。

P緩衝液

TES[N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulphonic acid]	5.73g
サッカロース	103g
塩化マグネシウム	2.03g

硫酸カリウム	0.5g
塩化カルシウム	3.68g
Trace element solution	2ml/L (pH7.4)

尚、1%リン酸一カリウム溶液を別に調製し、これを使用直前に100mlP緩衝液当たり1ml加えた。

Trace element solution

塩化亜鉛	40mg
塩化第二鉄	200mg
塩化第二銅	10mg
塩化マンガン	10mg
四硼酸ナトリウム	10mg
モリブデン酸アンモニウム	10mg/L

【 0 0 3 2 】

[実施例7] ストレプトマイセス・リビダンス3131-TS の形質転換

以下の各溶液を混合し、全量140 μ lとした。

BTG分泌発現プラスミドpUJ51DのDNA溶液	20 μ l
ストレプトマイセス・リビダンス 3131-TS プロトプラスト	100 μ l
0.35M サッカロース溶液	20 μ l

次に、20%ポリエチレングリコール1000を含むP緩衝液を1.5ml加えピペッティングにより穏やかに混合し室温で2分間静置した。この混合液を遠心分離（1,700g、室温、10分間）し、沈殿を集めた。沈殿として得られたプロトプラストをP緩衝液で2回繰り返し洗浄した。ペレットを1mlのP緩衝液に再懸濁した後に、200 μ lずつR-2培地に塗布した。

一方、以下に示したR-2/A及びR-2/Bを別調製した。

R-2/A

硫酸カリウム	0.5g
塩化マグネシウム	20.2g
塩化カルシウム	5.9g
グルコース	20.0g

プロリン	6.0g
カザミノ酸	0.2g
Trace element solution	4.0ml
寒天	44.0g/L

【 0 0 3 3 】

R-2/B

TES	11.5g
イースト・エキス	10.0g
サッカロース	203g/L (pH7.4)

プレート培地作製時にR-2/A、R-2/Bを混合し、更に1% KH_2PO_4 を最終容量200mlあたり1mlの割合で混合した。これらを30℃で18時間インキュベートした。その後、200 $\mu\text{g/ml}$ チオストレプトン及び400 $\mu\text{g/ml}$ チロシンを含むP緩衝液1mlを加え、プレートの表面を覆った。更に7日間プレートを30℃でインキュベートしチオストレプトン耐性を獲得した形質転換体 (ABL-1) を得た。

【 0 0 3 4 】

[実施例 8] ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) のプロトプラストの調製

前培養としてストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112をYEME培地+1% グルコース+25mM 塩化マグネシウム (pH7.0) で27℃、3日間培養した。次に、YEME 培地+1% グルコース+4mM 塩化マグネシウム+1% グリシン (pH7.0) に前培養後の培養液を0.5%接種した後、27℃で3日間培養した。培養後の培地を遠心分離 (3,000g、4℃、10分間) し、得られた菌体の湿重量を測定した。湿菌体0.6gに対し10mlの0.3Mサッカロース溶液で洗浄操作後、再び遠心分離 (3,000g、4℃、10分間) し、菌体を0.4mg/mlのリゾチーム (日本ロッシュ株式会社製) と0.1mg/mlのアクロモペプチダーゼ (和光純薬工業株式会社製) を含むBS-L緩衝液4mlに懸濁して30℃、30分間穏やかに攪拌した。次に氷中でBS-P緩衝液5mlを加え、BS-P緩衝液3mlで洗浄しながら脱脂綿を用いてろ過した。得られた懸濁液を遠心分離 (1,500g、4℃、5分間) し、BS-P緩衝液10mlで再懸濁後、再び遠心分離 (1,500g、4℃、5分間) した。得られた沈殿をBS-P緩衝液0.5mlで再懸濁した溶液をプロ

トプラスト懸濁液として後述の形質転換に使用した。

【0035】

BS-L緩衝液

10%肉エキス	10ml
イーストエキス	1g
ペプトン	2g
グルコース	10g
サッカロース	171.15g
塩化カルシウム	0.277g
塩化マグネシウム	0.508g/L(pH7.0)

【0036】

BS-P緩衝液

10%肉エキス	10ml
イーストエキス	1g
ペプトン	2g
グルコース	10g
サッカロース	171.15g
塩化カルシウム	2.77g
塩化マグネシウム	2.03g/L(pH7.0)

【0037】

[実施例9] ストレプトマイセス・モバラエンシスの形質転換

実施例8で得られたプロトプラスト懸濁液（プロトプラスト濃度 1×10^9 /ml）を $100 \mu\text{l}$ と実施例4で得られたBTG分泌発現プラスミドpUJ51D $1 \mu\text{g}$ を含む2M サッカロース溶液 $10 \mu\text{l}$ を混合した後、直ちに氷中に10秒間静置し、続いて25%ポリエチレングリコール1000（シグマアルドリッチジャパン社製）を含むP緩衝液0.5mlを加えた後、直ちに氷中に1分間静置し、続いてBS-P緩衝液を2ml加えた後、直ちに遠心分離（1,500g、4℃、10分間）した。得られた沈殿をBS-P緩衝液0.5mlで懸濁し、0.1mlずつSBS寒天培地に分注し、SBS軟寒天培地3mlを用いて攪拌しながら重層した。ふたを開けて正確に2時間乾燥した後、27℃で正確に24時間培養

した。更に200 μ g/ml チオストレプトンを含むSBS軟寒天培地3mlを重層して27℃で培養した。以上の操作の結果得られた形質転換体をABM-1とした。

【0038】

SBS寒天培地(pH7.0)

肉エキス	10g
イーストエキス	7.5g
トリプトンペプトン	1g
グルコース	10g
サッカロース	308.07g
寒天	25g/L(pH7.0)

SBS軟寒天培地(pH7.0)

肉エキス	10g
イーストエキス	7.5g
トリプトンペプトン	1g
グルコース	10g
サッカロース	308.07g
シーブラクアガロース	25g/L(pH7.0)

【0039】

[実施例10] BTG遺伝子を組み込んだ形質転換体の培養

実施例7で得られた形質転換体ABL-1、及び実施例9で得られた形質転換体ABM-1をそれぞれ以下の培地条件で30℃、7日間培養した。

ポリペプトン	20g
可溶性デンプン	20g
イーストエキス	2g
リン酸二カリウム	2g
硫酸マグネシウム	1g
アデカノールLG126	0.5g
50mg/ml チオストレプトン溶液	0.5ml/L(pH7.0)

上記条件下で培養した後の培地を遠心分離(12,000g、4℃、10分間)し、得ら

れた上清を以下のELISA法に供した。

【0040】

[実施例11] BTG生産量の定量 (ELISA法)

ストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112の培養上清からBlue Sepharose CL-6B (Pharmacia) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより得た精製BTGを抗原としてウサギを免疫することにより作製された抗BTG抗体を用いたELISA法によって、実施例10で得られた培養上清中のBTG量を定量した。

まず、96穴マイクロプレートの各ウェルにPBS緩衝液で希釈した抗BTG抗体溶液を100 μ lずつ分注し、37℃、1時間インキュベートして抗体をプレートに固定化した。抗体溶液を除いた後、0.1% Tween20を含むブロックエース（大日本製薬株式会社製）の10倍希釈液（以下、「洗浄液」という）200 μ lを用いて各ウェルを洗浄した。洗浄操作は続けて3回行った。次にブロックエース4倍希釈液200 μ lを各ウェルに分注し、37℃、1時間インキュベートしてブロッキングを行った。ブロックエース4倍希釈液を除去した後、各ウェルを洗浄液で3回洗浄した。次に測定サンプルである培養上清（ABL-1又はABM-1の培養上清）をブロックエースの10倍希釈液で適宜希釈し、希釈液を各ウェルに50 μ lずつ分注し、37℃、1時間インキュベートした。尚、スタンダードとしては、精製BTGをブロックエースの10倍希釈液でそれぞれ異なる濃度に調製したものを用意し、測定サンプルと同様にブロッキング処理後のウェルに添加した。

各ウェルからサンプル溶液を除去した後、各ウェルを洗浄液で3回洗浄した。次に抗BTG抗体 Fab' 断片にホースラディッシュペーパーオキシダーゼ (HRP) を架橋させたFab'-HRPを含むブロックエース10倍希釈液100 μ lを各ウェルに分注し、37℃、1時間インキュベートした。その後、Fab'-HRP溶液を除いた後、各ウェルを洗浄液で3回洗浄した。次に0.04% オルトフェニレンジアミン (o-PDA)、0.42% 過酸化水素液を含む50mMクエン酸ナトリウム溶液 (pH4.5) を各ウェルに150 μ lずつ分注し、37℃でインキュベートすることによりo-PDAと過酸化水素をHRPで反応させて発色させた。反応開始から正確に20分後に、反応の停止液として3M硫酸溶液を各ウェルに50 μ lずつ分注した後、各ウェルの波長492nmにおける吸光度を測定した。そして、スタンダードの吸光度から求めた標準曲線を用いて各培養上清ABL-

1又はABM-1) 中のBTG量を求めた。各培養上清あたりのBTG量を図6の表に示す。この表に示されるようにABL-1では0.7g/L、ABM-1では0.5g/LものBTGが生産された。既報の生産性 (40mg/L~50mg/L) と比較すれば、ABL-1では10倍以上、ABM-1では約10倍の生産性が得られたこととなり、極めて高い効率でBTGの生産を行えることが確認された。

【0041】

PBS緩衝液

塩化ナトリウム	8.0g
リン酸二ナトリウム	1.1g
塩化カリウム	0.2g
リン酸一カリウム	0.2g/L (pH7.4)

【0042】

[実施例12] SDS-PAGE

形質転換体ABL-1及び形質転換体ABM-1の培養上清をそれぞれ電気泳動用2xSDS緩衝液と1:1の割合で混合し、SDS-PAGE用サンプルとした。尚、対照 (コントロール) として、ストレプトマイセス・リビダンス3131-TSの培養上清、精製BTGをバッファで希釈したもの、ストレプトマイセス・モバラエンシスS-8112の培養上清を用意した。各サンプルを12.5%ゲルを用いたSDS-PAGEに供した。SDS-PAGEにはファルマシア・バイオテックのファストシステムを用い、染色は銀染色とした。染色後のゲルの写真を図7に示す。図7においてレーン1、2、3、4、及び5はそれぞれストレプトマイセス・リビダンス (*S. lividans*) 3131-TS培養上清、ABL-1の培養上清、精製BTG、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*S. mobaraensis*) S-8112の培養上清、及びABM-1の培養上清をアプライしたレーンである。また、レーンMは分子量マーカー (Pharmacia) をアプライしたレーンである。

図4に示されるように、ABL-1 (レーン2) 及びABM-1 (レーン5) では精製BTG (レーン3) とほぼ同じ位置にはっきりとしたバンドが観察され、BTGが高濃度で含有されていることが判る。一方、ストレプトマイセス・リビダンス (*S. lividans*) 3131-TSの培養上清 (レーン1) 及びストレプトマイセス・モバラエンシス (*S. mobaraensis*) S-8112の培養上清 (レーン4) では精製BTGと認められる

バンドは観察されない。このことから、ABL-1及びABM-1では特異的にBTGの産生が行われていることが判る。

2xSDS緩衝液

トリス塩酸塩	2.42g
EDTA	0.744g
SDS	50g
β -メルカプトエタノール	100ml/L(pH8.0)

【0043】

本発明は、上記発明の実施の形態の説明に何ら限定されるものではなく、特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【0044】

【発明の効果】

本発明によりトランスグルタミナーゼの生産性が極めて高い放線菌が提供される。当該放線菌を用いることによりトランスグルタミナーゼの効率的な生産を行うことができる。

【0045】

以下、次の事項を開示する。

(1) ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含有するベクターで宿主ストレプトマイセス・モバラエンシスを形質転換する工程、

前記構造遺伝子を発現可能な条件で形質転換体を培養する工程、及び
産生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

(2) 前記形質転換する工程が、前記宿主ストレプトマイセス・モバラエンシスが生育可能な条件で行われる (1) に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(3) 前記ベクターがプラスミドpIJ702を改変したプラスミドからなる、 (

1) 又は (2) に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(4) 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、(1) ~ (3) のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(5) 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、(1) ~ (4) のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(6) 前記宿主ストレプトマイセス・モバラエンシスが、ストレプトマイセス・モバラエンシス S-8112 又はその変異株である、(1) ~ (5) のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(7) 前記構造遺伝子が配列番号 1 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、(1) ~ (6) のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(8) 前記形質転換体が、外来的に導入された配列番号 2 の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する DNA 断片を保有する、(1) ~ (6) のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【0046】

(11) ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含有するベクターで宿主ストレプトマイセス・リビダンスを形質転換する工程、

前記構造遺伝子を発現可能な条件で形質転換体を培養する工程、及び
產生されたトランスグルタミナーゼを回収する工程、
を含んでなるトランスグルタミナーゼの生産方法。

(12) 前記形質転換する工程が、前記宿主ストレプトマイセス・リビダンスが生育可能な条件で行われる、(11) に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(13) 前記ベクターがプラスミド pIJ702 を改変したプラスミドからなる、

(11) 又は (12) に記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(14) 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、(11)～(13)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(15) 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、(11)～(14)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(16) 前記宿主ストレプトマイセス・リビダンスが、ストレプトマイセス・リビダンス3131又はその変異株である、(11)～(15)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(17) 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、(11)～(16)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

(18) 前記形質転換体が、外来的に導入された配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有するDNA断片を保有する、(11)～(16)のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼの生産方法。

【0047】

(21) ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含む発現ベクター。

(22) 前記プロモーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのプロモーターである、(21)に記載の発現ベクター。

(23) 前記ターミネーターが、ストレプトマイセス・モバラエンシス由来トランスグルタミナーゼのターミネーターである、(21)又は(22)に記載の発現ベクター。

(24) 前記構造遺伝子が配列番号1の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する、(21)～(23)のいずれかに記載の発現ベクター。

(25) 配列番号2の配列、又は該配列の一部が改変された配列であってトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する発現ベクター。

(26) (21)～(25)のいずれかの発現ベクターで形質転換された、ストレプトマイセス属に属する微生物。

【0048】

(31) 宿主放線菌をそれが生育可能な条件下でプロトプラスト化する工程

前記宿主放線菌が生育可能な条件下で、ストレプトマイセス・モバラエンシス (Streptomyces mobaraensis) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターを含む発現ベクターを宿主放線菌に導入する工程、を含む放線菌の形質転換方法。

(32) 前記宿主放線菌がストレプトマイセス・リビダンス又はストレプトマイセス・モバラエンシスである、ことを特徴とする(31)に記載の形質転換方法。

【0049】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AMANO ENZYME INC.

<120> Fungus producing transglutaminase

<130> P02-656

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1224

<212> DNA

<213> Streptomyces mobaraensis

<220>

<221> source

<222> (1)..(1224)

<223> transglutaminase gene

<400> 1

```
atgcgcatac gccggagagc tctcgtcttc gccactatga gtgcggtggt atgcaccgcc 60
ggattcatgc cgtcggccgg cgaggccgcc gccgacaatg gcgcggggga agagacgaag 120
tcctacgccg aaacctaccg cctcacggcg gatgacgtcg cgaacatcaa cgcgctcaac 180
gaaagcgctc cggccgcctc gagcgccggc ccgtcgttcc gggccccga ctccgacgac 240
agggtcacc ctcccgccga gccgctcgac aggatgcccg acccgtagcg tccctcgtac 300
ggcagggccg agacggtcgt caacaactac atacgcaagt ggcagcaggt ctacagccac 360
cgcgacggca ggaagcagca gatgaccgag gagcagcggg agtggctgtc ctacggctgc 420
gtcgggtgtca cctgggtcaa ttcgggtcag taccgacga acagactggc cttcgcgtcc 480
ttcgacgagg acaggttcaa gaacgagctg aagaacggca ggccccggtc cggcgagacg 540
cgggcggagt tcgaggccg cgtcgcgaag gagagcttcg acgaggagaa gggcttccag 600
cgggcgcgtg aggtggcgtc cgtcatgaac agggccctgg agaacgcca cgacgagagc 660
gcttacctcg acaacctcaa gaaggaactg gcgaacggca acgacgccct gcgcaacgag 720
gacgccggtt ccccggttcta ctcggcgctg cggaacacgc cgtccttcaa ggagcggaac 780
ggaggcaatc acgaccgctc caggatgaag gccgtcatct actcgaagca cttctggagc 840
ggccaggacc ggtcgagttc ggccgacaag aggaagtacg gcgacccgga cgccttccgc 900
cccggccgg gcaccggcct ggtcgacatg tcgagggaca ggaacattcc gcgcagcccc 960
accagccccg gtgagggatt cgtcaatttc gactacggct gggttcggcg ccagacggaa 1020
gcggacgccg acaagaccgt ctggaccac ggaaatcact atcacgcgcc caatggcagc 1080
ctgggtgcc a tgcattgtcta cgagagcaag ttccgcaact ggtccgaggg ttactcggac 1140
ttcgaccgcg gagcctatgt gatcaccttc atcccaaga gctggaacac cgccccgac 1200
aaggtaaagc agggctggcc gtga 1224
```

<210> 2

<211> 2393

<212> DNA

<213> Streptomyces mobaraensis

<400> 2

gatcttccgg gacatctgag gcgccggagg cgatccgagg cgcccaggc gtctgcgcga 60
agggcgccgc cgtgccgtcc atccccgtcc gcgtcgacgc gggccgggag ggggtgcggc 120
ggcgcccttc ggctgtgtgg acgaagcgtc gggtcggagg ggcggccgga tatcgtcctt 180
ggggcggggg ggccggaatt gccgccatgg tgttgccggg gaatcgaccc gaagacatga 240
tcacttctcg tatccaccg atcacgtatc cgggagtcga gaagtgttac gccgtgcccc 300
tgtccgcgtc ctcaccctg tcgccgtgac agcgacccgc gttcttcac tcgcacggac 360
ggccccacag gacctttcgg ccggggctcg ccccgccgcc tcggtgacgg cctccgaata 420
acgcggccgc cggggcctcg gccggttgac cgatccgggt cacgcgccc gccgggcggg 480
cgccacgtc cggctctgcc ccgccgaca tcgggtgcga ctgccttcgc tcgcacttct 540
tccgcctcc cggccgcgtt tttccgccgc cgaagggtcg gcgacgcgta ccgaatcccc 600
cttcatcgcg acgtgcttcc gcacggccgc gttcaacgat gttccacgac aaaggagttg 660
caggtttcca tgcgcatacg ccggagagct ctcgtcttcg ccactatgag tgcggtgtta 720
tgcaccgccg gattcatgcc gtcggccggc gaggccgcc cgcacaatgg cgcgggggaa 780
gagacgaagt cctacgccga aacctaccgc ctcacggcgg atgacgtcgc gaacatcaac 840
gcgctcaacg aaagcgctcc ggccgcttcg agcgccggcc cgtcgttccg ggcccccgac 900
tccgacgaca gggtcacccc tcccgccgag ccgctcgaca ggatgcccga cccgtaccgt 960
ccctcgtacg gcagggccga gacggtcgtc aacaactaca tacgcaagtg gcagcaggtc 1020
tacagccacc gcgacggcag gaagcagcag atgaccgagg agcagcggga gtggctgtcc 1080
tacggctgcg tcggtgtcac ctgggtcaat tcgggtcagt acccgacgaa cagactggcc 1140
ttcgcgtcct tcgacgagga caggttcaag aacgagctga agaacggcag gccccggtcc 1200
ggcgagacgc gggcggagtt cgagggccgc gtcgcgaagg agagcttcga cgaggagaag 1260
ggcttccagc gggcgcggtga ggtggcgtcc gtcatgaaca gggccctgga gaacgcccac 1320
gacgagagcg cttacctga caacctcaag aaggaactgg cgaacggcaa cgacgccctg 1380
cgcaacgagg acgcccgttc cccgttctac tcggcgctgc ggaacacgcc gtccttcaag 1440
gagcggaacg gaggcaatca cgacccgtcc aggatgaagg ccgtcatcta ctcgaagcac 1500
ttctggagcg gccaggaccg gtcgagttcg gccgacaaga ggaagtacgg cgacccggac 1560

gccttccgcc ccgccccggg caccggcctg gtcgacatgt cgagggacag gaacattccg 1620
cgcagcccca ccagccccgg tgagggattc gtcaatttcg actacggctg gttcggcgcc 1680
cagacggaag cggacgccga caagaccgtc tggaccacag gaaatcacta tcacgcgccc 1740
aatggcagcc tgggtgccat gcatgtctac gagagcaagt tccgcaactg gtccgagggt 1800
tactcggact tcgaccgagg agcctatgtg atcaccttca tcccaagag ctggaacacc 1860
gccccgaca aggtaaagca gggctggccg tgatgtgagc ggggtggagg ggagccggtt 1920
gcccggctcc cctccaccct ctccccgcc accacgaaag tcgctacagc tcgtgtcccg 1980
tcgtgtgtc gacgtgcgc gggagttcgc cctcgtggcg gtcgccgctc gtcgggggtc 2040
ccgtgggttc gaacatgagg atggaggcgc ccggggagga cggcttgtgt tcggtgccct 2100
tgggcaccac gaaggtgtcg cccttgtgca ggcgaccgt gtgttccgtt ccgtcggagt 2160
cgcgaggcgc cacgtcgaag cggccgtcca ggacaggaa gaactcgtcg gtgtcctcgt 2220
ggacgtgcca gacgtgctcg cctcgggtgt gggcgacgcg gacgtcgtag tcgttcatgc 2280
gggcgacgat gcgcgggctg tagacgtcgt cgaaggaggc gagggccttg gcgaggttga 2340
cgggctcggg gtcgttcatg gtccgagtct cggcgggagc ccgccgcggc gtc 2393

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

acaccgcact catagtggcg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

tccgtgcgag tggaagaacg

20

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gacggcctcc gaataac

17

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

atgtcgaggg acaggaac

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 7

caccacgaaa gtcgctac

18

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は実施例におけるシャトルベクター pSV1 の構築方法を示す図である。

【図 2】 図 2 はトランスグルタミナーゼ遺伝子を保有する分泌発現プラスミド pUJ51BD の構築方法を示す図である。

【図 3】 図 3 は実施例において決定されたトランスグルタミナーゼ (BTG) 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を示した図である。

【図 4】 図 4 は、トランスグルタミナーゼ (BTG) 遺伝子のプロモーター領域及び構造遺伝子の一部の塩基配列を示した図である。

【図 5】 図 5 は、トランスグルタミナーゼ (BTG) 遺伝子の構造遺伝子の一部及びターミネータ領域の塩基配列を示した図である。

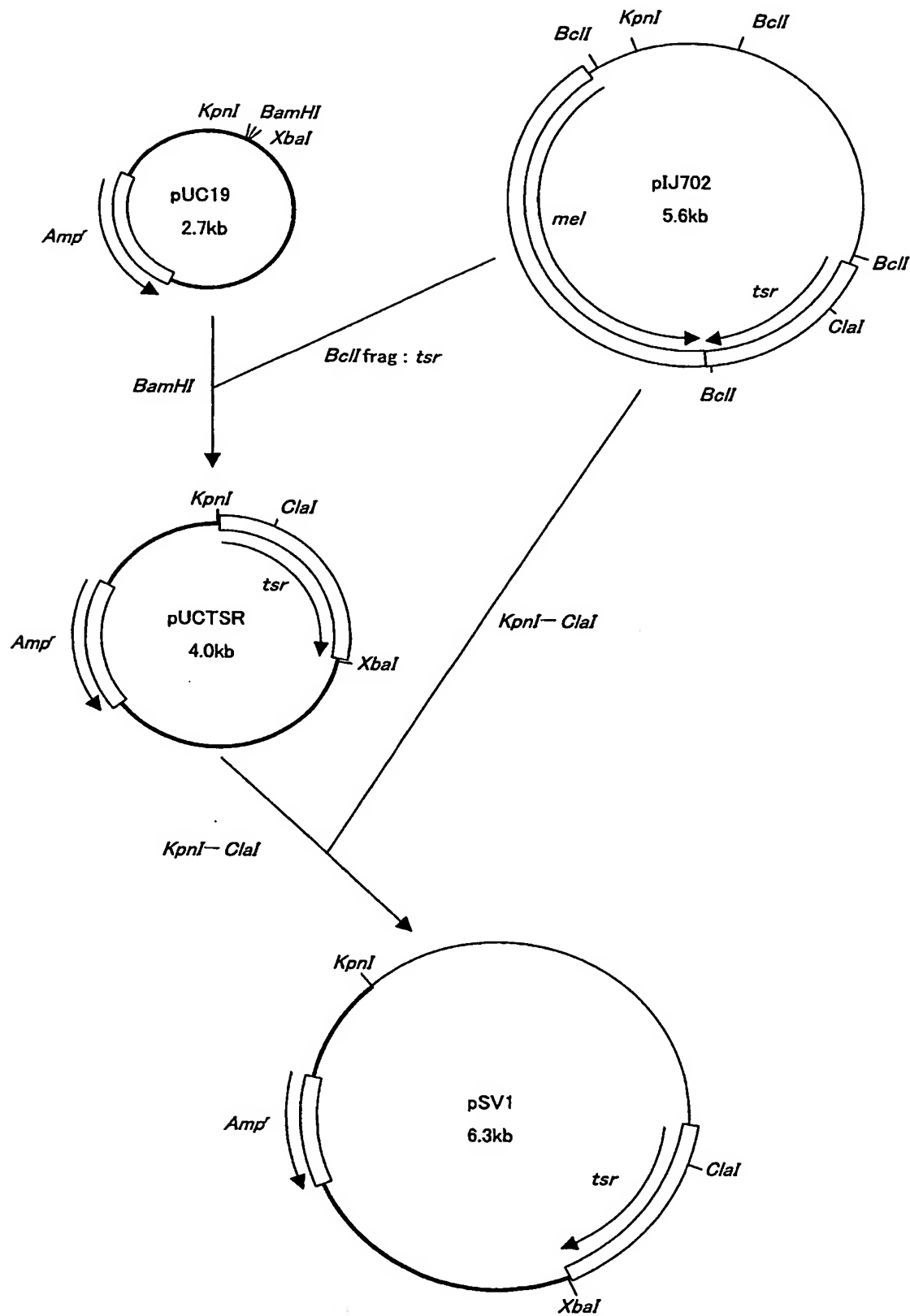
【図 6】 図 6 は形質転換体 ABL-1 及び ABM-1 の培養上清中における BTG 量を測定した結果をまとめた表である。

【図 7】 図 7 は形質転換体 ABL-1 及び ABM-1 の培養上清を電気泳動した結果 (銀染色後のゲル) を示す図である。レーン 1、2、3、4、及び 5 はそれぞれストレプトマイセス・リビダンス (*S. lividans*) 3131-TS の培養上清、ABL-1 の培養上清、精製 BTG、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*S. mobaraensis*) S-811 2 の培養上清、及び ABM-1 の培養上清をアプライしたレーンである。レーン M は分子量マーカー (Pharmacia) をアプライしたレーンである。

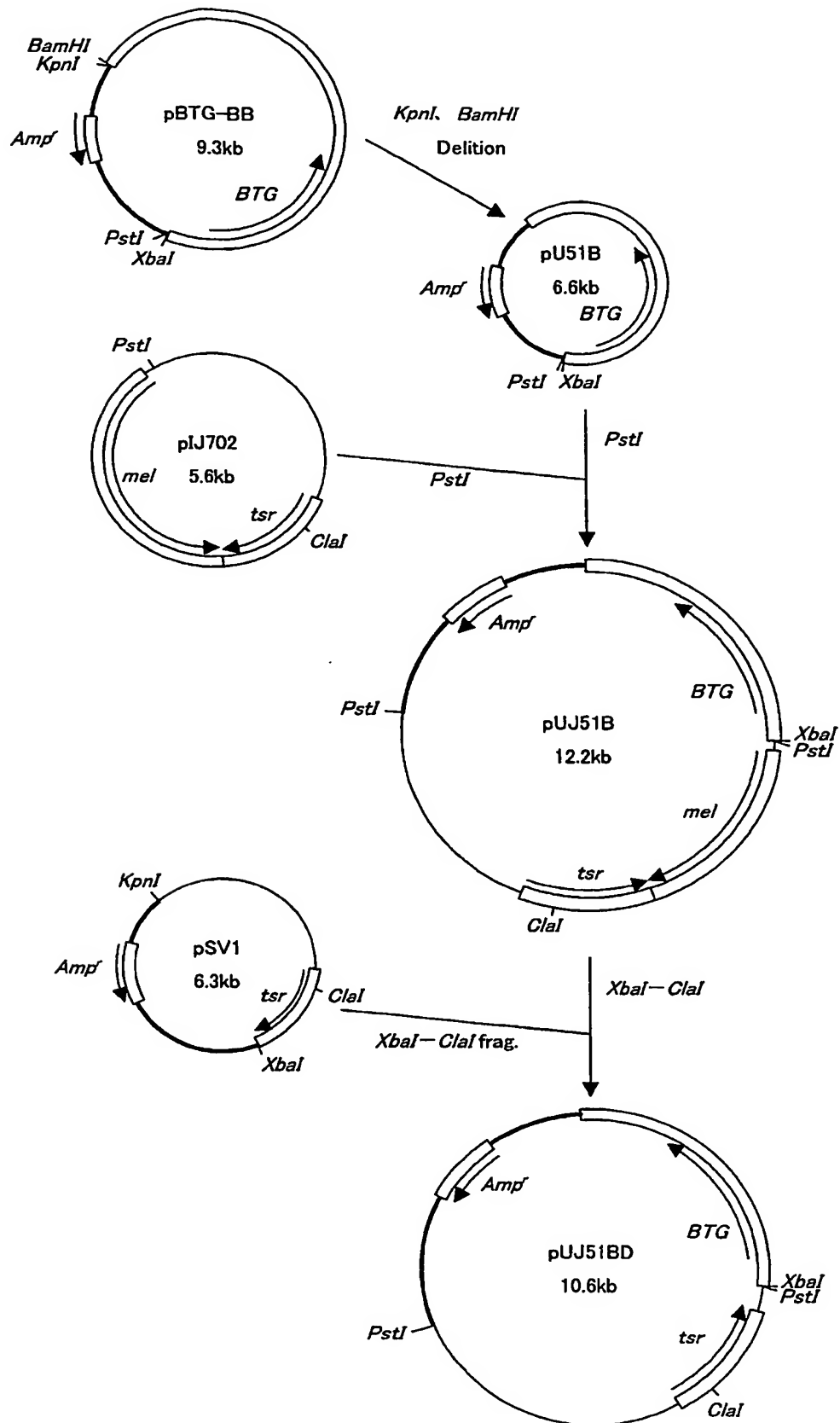
【書類名】

図面

【図1】



【図 2】



【図 3】

Sequence Range: 1 to 669

```

      10      20      30      40      50      60
GATCTTCGG GACATCTGAG GCGCCGAGG CGATCCGAGG CGCCCGAGGC GTCTGCGCGA

      70      80      90     100     110     120
AGGGCGCCGC CGTGCCGTCC ATCCCGTCC GCGTCGACGC GGGCCGGGAG GGGGTGCGGC

     130     140     150     160     170     180
GGCGCCCTTC GGCTGTGTGG ACGAAGCGTC GGGTCGAGG GCGGCCCGGA TATCGTCCTT

     190     200     210     220     230     240
GGGGCGGGGT GGCCGGAATT GCCGCCATGG TGTTGCCGGG GAATCGACCC GAAGACATGA

     250     260     270     280     290     300
TCACTTCTCG TATCCACCCG ATCACGTATC CGGGAGTCGA GAAGTGTTAC GCCGTGCCCC

     310     320     330     340     350     360
TGTCCGCGTC CTCACCCCTG TCGCCGTGAC AGCGACCCGC GTTCTTCCAC TCGCACGGAC

     370     380     390     400     410     420
GGCCCCACAG GACCTTTCGG CCCGGGCTCG CCCCGCCGCC TCGGTGACGG CCTCCGAATA

     430     440     450     460     470     480
ACGCGGCCGC CGGGGCCTCG GCCGGTTGAC CGATCCGGGT CACGCGCCCC GCCGGGCGGG

     490     500     510     520     530     540
CGGCCACGTC CGGTCTCGCC CCGCCCGACA TCGGCTGCGA CTGCCTTCGC TCGCACTTCT

     550     560     570     580     590     600
TCCCGCCTCC CGGCCGCGTT TTTCCGCCGC CGAAGGTGCG GCGACGCGTA CCGAATCCCC

     610     620     630     640     650     660
CTTCATCGCG ACGTGCTTCC GCACGGCCGC GTTCAACGAT GTTCCACGAC AAAGGAGTTG

CAGGTTTCC
```

【図 4】

GATCTTCCGG GACATCTGAG GCGCCGGAGG CGATCCGAGG CGCCCGAGGC GTCTGCGCGA 60
 AGGGCGCCGC CGTGCCGTCC ATCCCCGTCC GCGTCGACGC GGGCCGGGAG GGGGTGCGGC 120
 GGCGCCCTTC GGCTGTGTGG ACGAAGCGTC GGTTCGGAGG GGCGGCCGGA TATCGTCCTT 180
 GGGGCGGGGT GGCCGGAATT GCCGCCATGG TGTTGCCGGG GAATCGACCC GAAGACATGA 240
 TCACTTCTCG TATCCACCCG ATCACGTATC CGGGAGTCGA GAAGTGTTAC GCCGTGCCCC 300
 TGTCGCGGTC CTCACCCCTG TCGCCGTGAC AGCGACCCGC GTTCTTCCAC TCGCACGGAC 360
 GGCCCCACAG GACCTTTCGG CCCGGGCTCG CCCCGCCGCC TCGGTGACGG CCTCCGAATA 420
 ACGCGGCCGC CGGGGCTCG GCCGGTTGAC CGATCCGGGT CACGCGCCCC GCCGGGCGGG 480
 CGGCCACGTC CGGTCTCGCC CGGCCGACA TCGGCTGCGA CTGCCTTCGC TCGCACTTCT 540
 TCCCGCCTCC CGGCCGCGTT TTTCCGCCGC CGAAGGTGCG GCGACGCGTA CCGAATCCCC 600
 CTTATCGCG ACGTGCTTCC GCACGGCCGC GTTCAACGAT GTTCCACGAC AAAGGAGTTG 660
 CAGGTTTCC ATG CGC ATA CGC CGG AGA GCT CTC GTC TTC GCC ACT ATG AGT
 1 5 10
 Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser>
 720
 GCG GTG TTA TGC ACC GCC GGA TTC ATG CCG TCG GCC GGC GAG GCC GCC
 Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala>
 780
 GCC GAC AAT GGC GCG GGG GAA GAG ACG AAG TCC TAC GCC GAA ACC TAC
 Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr>
 840
 CGC CTC ACG GCG GAT GAC GTC GCG AAC ATC AAC GCG CTC AAC GAA AGC
 Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser>
 900
 GCT CCG GCC GCT TCG AGC GCC GGC CCG TCG TTC CGG GCC CCC GAC TCC
 Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser>
 GAC GAC AGG GTC ACC CCT CCC GCC GAG CCG CTC GAC AGG ATG CCC GAC
 Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp>
 960
 CCG TAC CGT CCC TCG TAC GGC AGG GCC GAG ACG GTC GTC AAC AAC TAC
 Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr>
 1020
 ATA CGC AAG TGG CAG CAG GTC TAC AGC CAC CGC GAC GGC AGG AAG CAG
 Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln>
 1080
 CAG ATG ACC GAG GAG CAG CGG GAG TGG CTG TCC TAC GGC TGC GTC GGT
 Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly>
 1140
 GTC ACC TGG GTC AAT TCG GGT CAG TAC CCG ACG AAC AGA CTG GCC TTC
 Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe>
 GCG TCC TTC GAC GAG GAC AGG TTC AAG AAC GAG CTG AAG AAC GGC AGG
 Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg>
 1200
 CCC CGG TCC GGC GAG ACG CGG GCG GAG TTC GAG GGC CGC GTC GCG AAG
 Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys>
 1260
 GAG AGC TTC GAC GAG AAG GGC TTC CAG CGG GCG CGT GAG GTG GCG
 Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala>

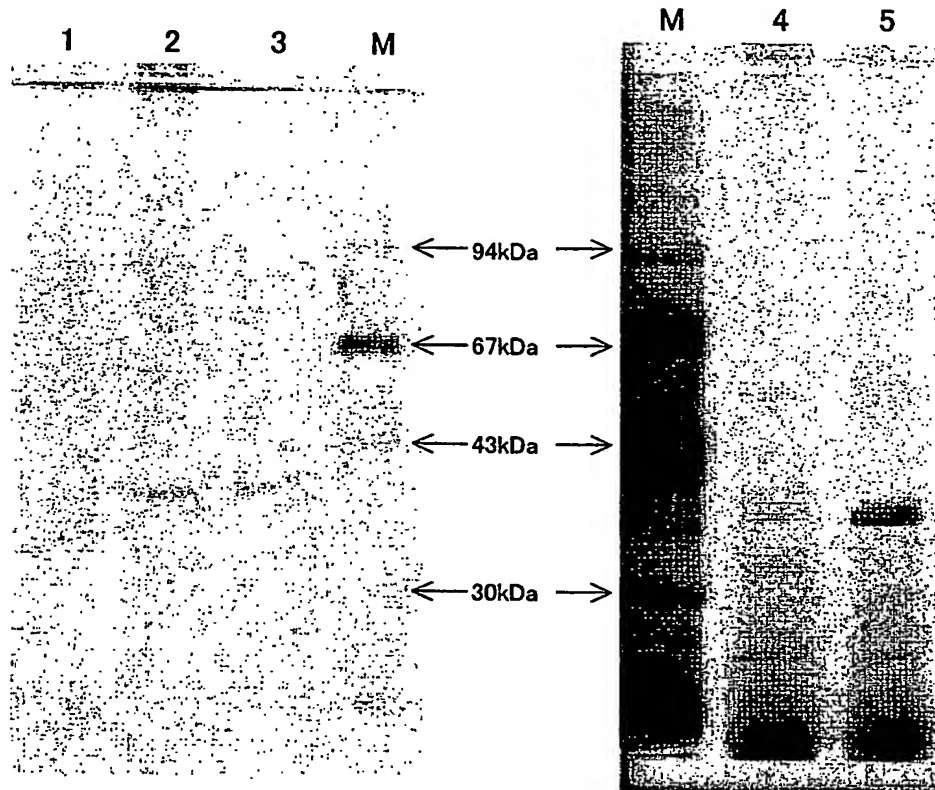
【図 5】

TCC GTC ATG AAC AGG GCC CTG GAG AAC GCC CAC GAC GAG AGC GCT TAC
 Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr>
 CTC GAC AAC CTC AAG AAG GAA CTG GCG AAC GGC AAC GAC GCC CTG CGC
 Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg>
 AAC GAG GAC GCC CGT TCC CCG TTC TAC TCG GCG CTG CGG AAC ACG CCG
 Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro>
 TCC TTC AAG GAG CGG AAC GGA GGC AAT CAC GAC CCG TCC AGG ATG AAG
 Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys>
 GCC GTC ATC TAC TCG AAG CAC TTC TGG AGC GGC CAG GAC CGG TCG AGT
 Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser>
 TCG GCC GAC AAG AGG AAG TAC GGC GAC CCG GAC GCC TTC CGC CCC GCC
 Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala>
 CCG GGC ACC GGC CTG GTC GAC ATG TCG AGG GAC AGG AAC ATT CCG CGC
 Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg>
 AGC CCC ACC AGC CCC GGT GAG GGA TTC GTC AAT TTC GAC TAC GGC TGG
 Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp>
 TTC GGC GCC CAG ACG GAA GCG GAC GCC GAC AAG ACC GTC TGG ACC CAC
 Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His>
 GGA AAT CAC TAT CAC GCG CCC AAT GGC AGC CTG GGT GCC ATG CAT GTC
 Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val>
 TAC GAG AGC AAG TTC CGC AAC TGG TCC GAG GGT TAC TCG GAC TTC GAC
 Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp>
 CGC GGA GCC TAT GTG ATC ACC TTC ATC CCC AAG AGC TGG AAC ACC GCC
 Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala>
 CCC GAC AAG GTA AAG CAG GGC TGG CCG TGA TGTGAGC GGGGTGGAGG
 Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro ***>
 GGAGCCGGTT GCCCGGCTCC CCTCCACCCT CTCCCCGCC ACCACGAAAG TCGCTACAGC
 TCGTGTCCCG TCGTGCTGTC GACGTGCGCC GGGAGTTCGC CCTCGTGGCG GTCGCCCGTC
 GTCGGGGTGC CCGTGGGTTT GAACATGAGG ATGGAGGCGC CCGGGGAGGA CGGCTTGTGT
 TCGGTGCCCT TGGGCACCAT GAAGGTGTG CCGTTGTGCA GGCGCACCGT GTGTTCCGTT
 CCGTCGGAGT CGCGGAGCGC CACGTGCAAG CGGCCGTCCA GGACGAGGAA GAACTCGTCG
 GTGTCTCTGT GGACGTGCCA GACGTGCTCG CCTCGGGTGT GGGCGACGCG GACGTCTAG
 TCGTTCATGC GGGCGACGAT GCGCGGGCTG TAGACGTCGT CGAAGGAGGC GAGGGCCTTG
 GCGAGGTTGA CGGGCTCGGT GTCGTTTCATG GTCCGAGTCT CGGCGGGAGC CCGCCGCGGC
 GTC

【図 6】

	培養上清中の BTG 量
ABL-1:pUJ51BD/ <i>S.lividans</i> 3131TS	0.7 g/L
ABM-1:pUJ51BD/ <i>S.mobaraensis</i> S-8112	0.5 g/L

【図 7】



- 1 *S.lividans*
- 2 ABL-1:pUJ51BD/*S.lividans*
- 3 精製 BTG
- 4 *S.mobaraensis*
- 5 ABM-1:pUJ51BD/*S.mobaraensis*

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 トランスグルタミナーゼを高効率で生産し得る菌株、及び該菌株を用いたトランスグルタミナーゼの生産方法を提供する。

【解決手段】 ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼの構造遺伝子、並びに該構造遺伝子に作用するプロモーター及びターミネーターをストレプトマイセス・モバラエンシスに外来的に導入して形質転換体を得る。この形質転換体を培養してトランスグルタミナーゼを生産する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-263834
受付番号	50201352027
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 9月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 9月10日
-------	-------------

特願 2002-263834

出願人履歴情報

識別番号

[000216162]

1. 変更年月日

2000年12月11日

[変更理由]

名称変更

住所

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

氏名

天野エンザイム株式会社